島根保環研所報
第52号（2010）

資　料

リアルタイムPCR法を利用した*C.jejuni*と*C.coli*の混合感染事例の検討

川瀬　遵・熱田純子・寺本彩香・高橋起男・黒崎守人・勝部和徳

１．はじめに

*Campylobacter*属菌による下痢症患者から分離されるのは、約90％が*Campylobacter jejuni*（*C.jejuni*）、数％が*Campylobacter coli*（*C.coli*）と言われている[1]。集団食中毒についても*C.coli*が分離される事例は少なく、*Campylobacter*食中毒全体の数％程度と考えられる。平成22年10月に、島根県内で発生した集団食中毒事例（患者９名）では、当初、病因物質を*C.jejuni*と同定し菌株を保存したが、その後、リアルタイムPCR法により再検討したところ、患者便抽出DNAから*C.jejuni*と*C.coli*の両遺伝子が検出され、保存した患者由来の菌株は*C.coli*と同定された。今回、本事例で行った検討結果を報告する。

２．材料と方法

２．１　事件の概要

県内医療機関から「下痢等の症状のある患者が受診したが、その患者の他に10月１日に上記飲食店で一緒に食事をした者からも同様の症状がでている」旨、管轄保健所に連絡があった。保健所の調査により、10月１日に同飲食店で喫食した９名が、10月４日から５日にかけて、下痢（９名）、発熱（５名）、嘔気（４名）を呈していることが判明した。患者９名は全員、鶏肉を生で喫食していた。

２．２　食中毒菌検査（１回目）

島根県細菌性食中毒・感染症検査マニュアルに準じて、患者便２検体、従事者便２検体、食材（鶏肉）７検体、ふき取り10検体を12種類の選択分離培地に塗抹し、培養した。なお、食材は生理食塩水を加え、ストマッカーで乳剤を作成した後、選択分離培地で直接培養を行うとともに、プレストン培地で増菌培養後、１白金耳をスキロー及びCCDA培地に塗抹し、42℃ 48時間微好気培養した。各種選択分離培地で食中毒菌を疑う菌集落が確認された場合は、生化学性状試験などを行い、菌の同定を行った。

２．３　患者糞便からのＤＮＡの抽出

QIAampDNA Stool Mini kit（Qiagen）及びISOFECAL Beads Beating（Nippon gene）を使用し、取扱説明書に従って、患者糞便２検体からDNAを抽出した。

２．４　MultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法（SG-PCR法）

患者糞便DNA試料について、24種類の食中毒菌遺伝子の検討を行った。方法は、Fukushima[2]らの報告に準じて、インターナル・アンプリフィケーション・コントロール（IAC）として、Yersinia ruckeri（JCM15110）から抽出した少量のDNAを用いて、IAC検出プライマーと３種類の食中毒菌遺伝子を検出するプライマーのセットを８セット調製し、リアルタイムPCRを行った。PCR結果の判定は、融解曲線分析によるPCR産物のTm値と陽性コントロールのTm値を比較することでPCR産物が同一であることを確認した。融解曲線分析でIACと同一のPCR産物のみが確認された場合は陰性とした。リアルタイムPCR装置は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800（Takara）を使用し、反応試薬はSYBR Premix Dimer Eraser（Takara）を用いた。試薬調製とPCR反応条件はFukushima[2]らの報告に準じて行った。

（対象菌種）

大腸菌（EIEC、EPEC、EHEC、ETEC、EAEC、DAEC)、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp、*Y.enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*、*P. alcalifaciens*、*C.jejuni*、*C. coli*、*V. cholerae*、TRH 産生*V.parahaemolyticus*、*A.Hydrophila*、*S.aureus*、*B.cereus*（嘔吐毒産生および下痢毒産生菌)、*C.perfringens*、*L.monocytogenes*、TDH産生*V.parahaemolyticus*、*P.shigelloides*

２．５　分離保存された患者由来及び食材由来の菌株の培養、PCR検査、生化学性状検査等

2.2の検査で分離され、*C.jejuni*として保存された患者由来の菌株６株、食材由来の菌株２株について、CCDA培地に塗沫し、42℃、48時間培養し、発育したコロニーからDNAを抽出した。*Campylobacter*属の菌種同定は、Fukushimaら[2]が報告している*C.jejuni*種特異的領域（AB-F：CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC and AB-R:AGGCACGCCTAAACCTATAGCT　増

幅産物86bp Tm77.7±0.96）と*C.coli*の*ceuE*遺伝子（ceuE- For:CAAGTACTGCAATAAAAACTAGCACTACG and ceuE-Rev:AGCTATCACCCTCATCACTCATACTAATAG 増幅産物72bp Tm73.7 ±0.43）を検出するプライマーを用いて、リアルタイムSYBR Green PCR法により検討を行った。

また、生化学性状試験（オキシダーゼ、カタラーゼ、酢酸インドキシル加水分解試験、馬尿酸加水分解試験、25℃発育試験）も行い、PCRの結果と比較した。

2.6　パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE解析）

八尋ら[3]や須釜ら[4]の報告を参考に実施した。患者由来及び食材由来の*C.coli* を、制限酵素*Sma* I と*Kpn*Iで処理後、CHEF-DRⅢ（BIORAD）を用いて0.5×TBE buffer、1％アガロースゲルにより電圧6.0V/㎝，パルスタイム6.8～38.4秒、バッファー温度14℃、泳動時間19時間の条件下で電気泳動を行った。

2.7　過去に県内発生したカンピロバクター食中毒分離株などの検討

過去に県内で発生した*C.jeuni*食中毒事例で、*C.coli*にも感染した事例がなかったか検討するため、食中毒患者の糞便DNA試料について（2004～2010年、9事例56検体）、2.5に示すプライマーを使用して、*C.coli*の*ceuE*遺伝子の有無をリアルタイムSYBR Green PCR法で検討した。

3．結　　果

3.1　食中毒菌検査（1回目）

患者便2検体中2検体、食材7検体中6検体から*Campylobacter* が、食材7検体中1検体から*Salmonella* sp.（O7群）が分離された。分離された*Campylobacter*は馬尿酸加水分解試験などの生化学性状試験により、*C. jejuni*と同定された。

3.2　MultiplexリアルタイムSYBR Green PCR法（SG-PCR法）

患者2名の糞便DNA試料について、24種の食中毒菌遺伝子を検討した結果、プライマーセットB（*ceuE*遺伝子、*C.jejuni*種特異的遺伝子、*trh*遺伝子を検出するプライマーセット）において遺伝子の増幅が確認され、融解曲線分析により、患者1はTm1が73.95、Tm2が77.40、患者2はTm1が74.14、Tm2:77.39であり、陽性コントロールと比較すると、*C.coli*と*C.jejuni*のTm値とほぼ一致した（図1）。*ceuE*遺伝子、*C.jejuni*種特異的遺伝子検出プライマーを用いて、single-PCRも行ったが、患者2名とも両遺伝子が陽性であった。その他、患者2名中1名で、*astA*遺伝子、*FemB*遺伝子が陽性となった。

3.3　分離保存された患者由来及び食材由来の菌株の培養、PCR検査、生化学性状検査等

2.2の検査で分離され、*C.jeuni*として保存された患者由来の菌株2株、食材由来の菌株6株のリアルタイムSYBR Green PCR法の結果は表1、生化学性状試験の結果は表2のとおりとなった。患者2名由来の菌株は*C.coli*と判定された。食材由来の菌株では、もも、せせり、砂ずりは*C.jejuni*、皮と軟骨は*C.coli*と判定された。手羽先は生化学性状試験で*C.jejuni*と判定されたが、PCR法で*C.jejuni*と*C.coli*が混在していることが明らかとなった。手羽先から培養した*C.jejuni*と*C.coli*が混合した菌体は、さらに再培養を行い、*C.coli*を分離保存した。
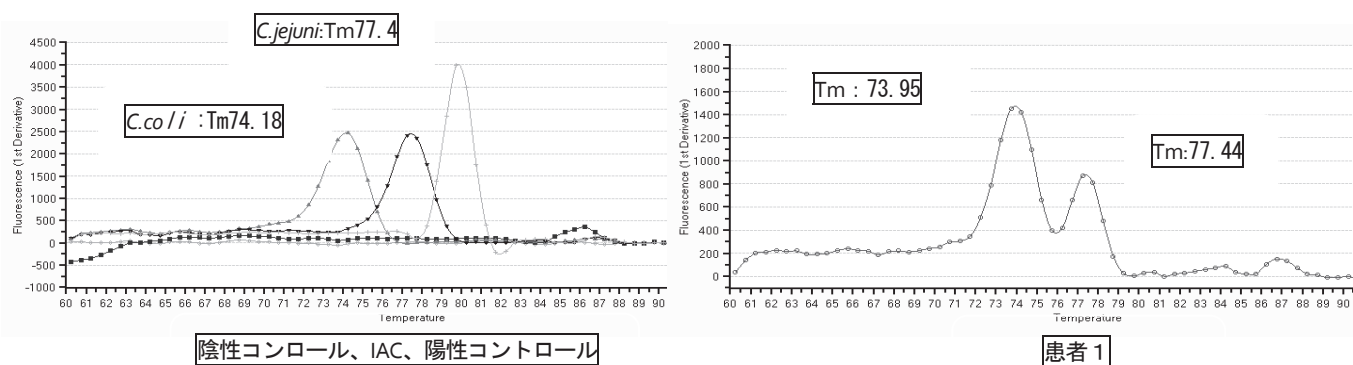
図1　SG-PCR法の結果（融解曲線分析）

表１　患者由来及び食材由来の菌株の結果
（リアルタイムSYBR Green PCR法）

検体名＼PCR結果	*C.jejuni*種 特異的遺伝子	*ceuE* 遺伝子	判定
手羽先**	＋	＋	*C.jejuni* *C.coli*
もも	＋	－	*C.jejuni*
せせり	＋	－	*C.jejuni*
砂ずり	＋	－	*C.jejuni*
皮	－	＋	*C.coli*
軟骨	－	＋	*C.coli*
患者１	－	＋	*C.coli*
患者２	－	＋	*C.coli*

** : *C.jejuni* と *C.coli* が混在

表２　患者由来及び食材由来の菌株の結果
（生化学性状試験）

食材名＼ 性状結果	オキシダーゼ	カタラーゼ	酢酸インドキシル加水分解	馬尿酸加水分解	25℃発育	42℃発育	判定
手羽先**	＋	＋	＋	＋	－	＋	*C.jejuni*
もも	＋	＋	＋	＋	－	＋	*C.jejuni*
せせり	＋	＋	＋	＋	－	＋	*C.jejuni*
砂ずり	＋	＋	＋	＋	－	－	*C.jejuni*
皮	＋	＋	＋	－	－	＋	*C.coli*
軟骨	＋	＋	＋	－	－	＋	*C.coli*
患者１	＋	＋	＋	－	－	＋	*C.coli*
患者２	＋	＋	＋	－	－	＋	*C.coli*

** : *C.jejuni* と *C.coli* が混在

３．４　パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE解析）

C.coli ５株（患者由来株２株と食材由来株３株）は、制限酵素*Sma* Ⅰと*Kpn*Iにより、すべてが同一パターンを示した（図２）。

３．５　過去に県内発生した*C.jejuni*食中毒事例の検討

食中毒患者糞便DNA試料９事例56検体について検討した結果、１事例で*C.coli*が１検体陽性であった。この事例は平成17年に学校で発生した腹痛、下痢の集団発生事例であり、患者１名から*C.jejuni*が分離されたものの、病因物質の特定には至っていない事例であった（表３）。

４．考　　察

本事例発生時の検査では、病因物質は*C.jejuni* と同定され、県庁主管課と管轄の保健所に結果を報告した。しかし、患者便DNA試料について、SG-PCR法で検討した結果、*C.coli*と*C.jejuni*の両遺伝子が陽性となったことから、患者２名は*C.coli*と*C.jejuni*の混合感染をうけたのではないかと推察された。

SG-PCR法の結果から、以前に分離保存された患者由来及び食材由来の菌株をリアルタイムSYBR Green PCR法により再検討した結果、患者２名の菌株は*C.coli*、もも、せせり、砂ずりの菌株は、*C.jejuni*、皮、軟骨の菌株は、*C.coli*であった。手羽先は*C.jejuni*と*C.coli*が混在していた。生化学性状試験については、手羽先は*C.jejuni*となり、それ以外についてはリアルタイムSYBR Green PCR法の結果と同じであった。当初の食中毒菌検査で、病因物質を*C.jejuni*と同定したことや手羽先由来の菌株を生化学性状試験で*C.jejuni*と同定した理由は、馬尿酸加水分解試験で反応液が濃青色（陽性）となったことが判断材料となったが、これらは、*C.coli*と*C.jejuni*が混在していた試料を馬尿酸加水分解試験に使用したことが誤判定の原因と考えられた。また、*Campylobacter*の選択分離培地はスキロー培地やCCDA培地を使用しているが、*Campylobacter*は遊走するなど単一の菌集落を形成しにくく、臨床検体からの初代培養では、培地上のコロニー形態・色調から菌種の推定は困難である。これらのことが単一の菌集落採取を難しくしていると考えられた。Aishaら[5]は、74株の*Campylobacter*について馬尿酸加水分解試験を行った結果、偽陰性と偽陽性の結果が得られたこと、ひとつの検体に*C.coli*と*C.jejuni*が混在している場合、馬尿酸加水分解試験では陽性と判定されたことを報告している。

SG-PCR法は、生化学性状試験で検出できなかった*C.jejuni*と*C.coli*の混合感染を検出することができたことから、*C.jejuni*と*C.coli*の混合感染の検出に有効な方法であり、食中毒菌検査の精度や迅速性向上につながるのではないかと考えられた。

PFGE解析では、バンドパターンが患者分離株と食材分離株（手羽先、軟骨、皮）で一致した。食材は患者が喫食したものとロット番号が異なるが仕入先は同じものであり、疫学的にも関連性があることから、鶏肉を介して*C.coli*の暴露を受けた可能性が高いと考えられた。

過去の食中毒患者便DNA試料９事例56検体について再検討をしたところ、１事例（６検体）で*C.coli* が１検体陽性であった。この事例は平成17年に学校で発生した腹痛、下痢の集団発生事例であり、患者１名か*C.jejuni*が分離されたものの、病因物質の特定には至っていない事例であった。この事例で分離された保存菌株がないため、より詳細な検討が困難であるが、*C.coli*の感染の可能性は否定できないと考えられた。

M ラムダラダー
1 患者1
2 患者2
3 手羽先
4 皮
5 軟骨
M ラムダラダー

写真左：*Sma* I 処理
写真右：*Kpn*I 処理
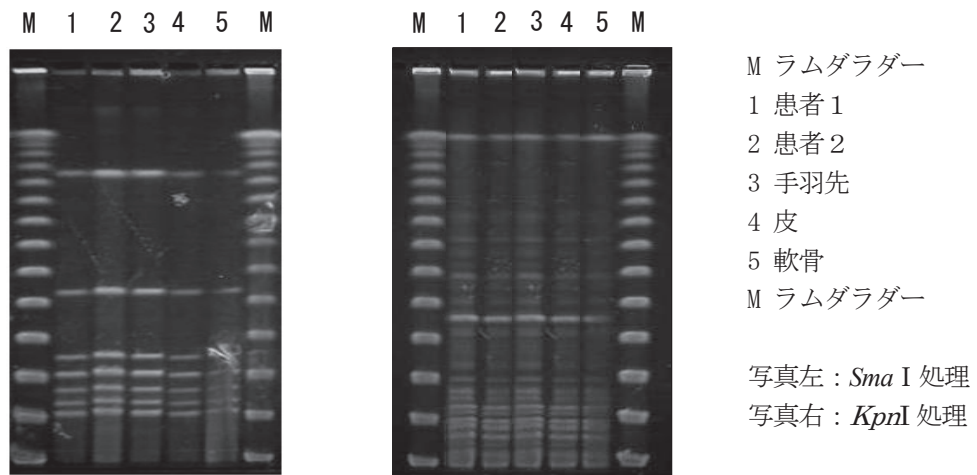
図2　患者由来と食材由来株のPFGEの比較

表3　9事例の検討結果（SG- PCR法）

事例番号	発生日	患者集団	原因食品	患者数	検査数	リアルタイムPCR結果 *C.coli*陽性数	培養結果 （分離数）
1	2004/6/11	キャンプの参加者 （高校生）	焼肉	4/8	7	0	*C.jejuni* 5
2	2004/6/12～13	焼肉店を利用した 利用者9グループ	焼肉	30/不明	7	0	*C.jejuni* 5
3	2004/6/17	調理実習に参加 した高校生	調理実習で調製 された昼食	31/41	7	0	*C.jejuni* 6
4	2004/11/5～7	飲食店の利用客	不明	5	5	0	*C.jejuni* 2
5	2005/10/2～6	小学生と中学生	不明 （学校の昼食）	39/94	6	1	*C.jejuni* 1
6	2006/12/22	飲食店の利用客	鶏肉	12/12	7	0	*C.jejuni* 4
7	2007/11/29	飲食店の利用客	鶏の生レバー	8/13	7	0	*C.jejuni* 4
8	2008/3/28	飲食店の利用客	不明	2/7	4	0	*C.jejuni* 2
9	2010/7/31	飲食店の利用客 （専門学校生）	焼肉	10/13	13	0	*C.jejuni* 4

一人の患者便やひとつの検体試料から*C.coli*と*C.jejuni*が両方とも分離された事例は、他自治体でも報告[6) 7)]があり、今後も*C.coli*と*C.jejuni*の混合感染事例が発生することを考慮して、迅速的且つ正確に菌種を判定できるリアルタイムPCR法を利用することは有用な方法と考えられた。

文　献

1) IASR, 31, 1 (2010)
2) Fukushima, H. et al. : Int. J. Microbiol., pii: 864817 (2010)
3) 八尋ほか：厚生労働科学研究　新興・再興感染症研究事業　広域における食品由来感染症を迅速に察知するために必要な情報に関する研究　平成18年度　総括・分担研究報告書
4) 須釜ほか：福島県衛生研究所年報, 21, 40 (2003)
5) Aisha, A, A. et al. : J, Med, Microbiol., 56, 1350 (2007)
6) 小野ほか：日食微誌, 21 (2), 151 (2004)
7) 高橋ほか：宮城県保健環境センター年報, 27, 40 (2009)
8) Suzuki, H. et al. : J. Vet. Med. Sci, 7 (3), 255 (2009)